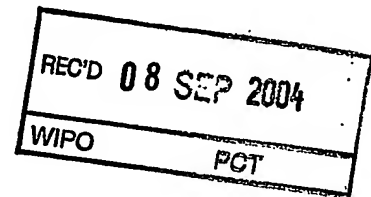


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 30 981.0

Anmeldetag: 09. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: Prisma Diagnostika GmbH,
13125 Berlin/DE

Bezeichnung: Vorrichtung und Verfahren zur simultanen
Durchführung von Blutgruppenbestimmung,
Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test

IPC: G 01 N 33/50

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Letang

**Vorrichtung und Verfahren zur simultanen Durchführung
von Blutgruppenbestimmung,
Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test**

5

10

15

20

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für Lateral-Diagonal-Fluss Multiparameter Tests, insbesondere auf den Gebieten der Immunhämatologie und der Infektionsserologie, zum gleichzeitigen, qualitativen oder quantitativen Bestimmen mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend eine Membran mit einer Aufgabezone zum Auftragen der flüssigen Probe, mindestens zwei Indikatorzonen, die mit dem/den Analyten in Wechselwirkung treten können und mindestens einem Absorptionsbereich, welcher die Flüssigkeit nach Passieren der Indikatorzonen aufnimmt, wobei die Indikatorzonen zwischen der Aufgabezone und einem Absorptionsbereich liegen, dadurch gekennzeichnet, dass die Fließrichtungen von der Aufgabezone durch die jeweiligen Indikatorzonen zu einem Absorptionsbereich (Fließspuren) im Wesentlichen parallel sind und mindestens zwei unterschiedliche Fließspuren vorliegen.

25

Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Bestimmung mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend das Auftragen der Probe auf die Aufgabezone einer Membran der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei diese Probe in ausreichender Menge vorliegt, um die Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in Richtung Absorptionsbereich durch die Indikatorzonen zu fließen und um die Analyten oder ihre Derivate in der Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in den Indikatorzonen einen Komplex zu bilden, insbesondere zur simultanen Bestimmung von zellulären und plasmatischen Parametern, vorzugsweise zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörper-

such-Test sowie zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung transfusionsrelevanter infektionsserologischer Marker sowie zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung von Antikörpern, die gegen andere Blutzellen als Erythrozyten gerichtet sind, insbesondere anti-Thrombozyten und anti-Lymphozyten Antikörper.

Um Komplikationsrisiken z. B. bei einer Transfusion, insbesondere Blutgruppenunverträglichkeiten, viralen und/oder bakteriellen Kontaminationen, vorzubeugen, werden bekanntermaßen verschiedene Labortests am Spender- und Patientenblut vorgenommen zur Bereitstellung von Komponenten, die mit dem Rezipienten blutgruppenserologisch kompatibel sind und frei von bekannten übertragbaren Pathogenen sind. Die jeweiligen serologischen Tests beinhalten in der Regel die Blutgruppenbestimmung beim Spender und Empfänger, insbesondere von Blutgruppen der Blutgruppensysteme AB0, Rh und Kell, Serumgegenprobe beim Spender und Empfänger, Antikörpersuche nach irregulären Antikörpern, beim Spender und Empfänger sowie Antikörperidentifizierung beim Empfänger bei Vorliegen irregulärer Antikörper. Der Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten und/oder Lymphozyten wird im Zusammenhang mit Transfusionen und Transplantationen ebenfalls durchgeführt.

Infektionsserologische Tests am Spender umfassen bekanntermaßen die routinemäßige Bestimmung von Antikörpern insbesondere gegen HIV-1, HIV-2, gegen HCV, gegen *Treponema pallidum* (Syphilis) sowie die Bestimmung des Hepatitis B Oberflächen-Antigens (= HbsAg: Hepatitis surface Antigen).

In der blutgruppenserologischen Diagnostik werden allgemein Parameter nachgewiesen, die besonders im Zusammenhang mit Transfusionen bzw. dem Morbus Hämoliticus Neonatorum (Mhn) von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich unter anderem um den Nachweis von Antigenen auf der Oberfläche der Erythrozyten, die für die Blutgruppen charakteristisch sind (Blutgruppenbestimmung). Weitere wichtige Antigensysteme befinden sich auch auf Thrombozyten, Granulozyten,

Lymphozyten, die ebenfalls bei Transfusion und Transplantation eine Rolle spielen. Bei Thrombozyten- und Granulozyten-Antigenungleichheit zwischen Mutter und Fötus kann es zu Mhn vergleichbaren Krankheitsbildern am Neugeborenen kommen. Ferner handelt es sich um den Nachweis von regulären Blutgruppen-
5 Antikörpern (Isoagglutinine) und um den Nachweis von irregulären Blutgruppen-Antikörpern im Serum oder Plasma.

Die Isoagglutinine oder regulären Antikörper werden von allen Menschen frühzeitig nach der Geburt erworben und korrespondieren zur jeweiligen Blutgruppe des AB0-Systems. Sie sind gegen diejenigen Blutgruppenantigene A bzw. B, die dem Individuum selbst fehlen, gerichtet, d. h. Personen mit Blutgruppe A haben anti-B, Personen mit Blutgruppe B haben anti-A, Personen mit Blutgruppe 0 haben anti-A und anti-B; Personen mit Blutgruppe AB haben keine Isoagglutinine. Die regulären Antikörper werden auch „komplett“ genannt, weil sie Erythrozyten
10 im NaCl-Milieu direkt agglutinieren können.

Die irregulären- oder Alloantikörper werden im Gegensatz zu den Isoagglutininen durch spätere Immunisierungen erworben, v. a. durch Transfusion oder Schwangerschaft. Deshalb haben die meisten Menschen keine irregulären Blutgruppenantikörper. Die transfusionsrelevanten irregulären Antikörper sind in der Regel
20 wärmereaktiv und gehören überwiegend der IgG-Klasse an. Sie sind im Gegensatz zu den regulären Antikörpern im NaCl-Milieu nicht in der Lage, Erythrozyten direkt zu agglutinieren.

Bekanntermaßen werden zur Blutgruppenbestimmung die Erythrozyten der zu
25 testenden Person (Spender oder Empfänger) mit Reagenzien, welche blutgruppenspezifische Antikörper enthalten, zusammengebracht. Üblicherweise handelt es sich um Flüssigkeitstests, bei denen durch Mischen einer Erythrozyten-haltigen Probe mit einer Probe, welche Antikörper enthält, die gegen ein bestimmtes Blutgruppenmerkmal gerichtet sind, ein Testansatz hergestellt wird. Der Testansatz
30 wird dann über einen definierten Zeitraum und unter definierten Bedingungen inkubiert und nach Abschluss der Inkubation oder direkt oder nach einem Zentri-

fugationsschritt entweder visuell oder mit optischen Methoden auf eine eventuelle Agglutination oder Adsorption der Erythrozyten überprüft. Die vorherrschende Endpunktmessung in der Blutgruppenserologie ist nach wie vor die Hämagglutination. Für jede zu bestimmende Blutgruppe muss ein eigener Ansatz pipettiert werden, d. h. z. B. die Bestimmung der 9 wichtigsten Blutgruppen A, B, D, C, c, E, e, Cw und K erfordert ohne Kontrolle 9 getrennte Ansätze.

10 Für die Serumgegenprobe werden bekanntermaßen Zellreagenzien mit bekannter AB0-Blutgruppe (A1, A2, B, 0) verwendet, welche mit dem Serum oder Plasma der zu testenden Person inkubiert werden. Nach einem Zentrifugationsschritt wird visuell bzw. mit optischen Methoden auf eine eventuelle Agglutination der Erythrozyten hin überprüft. Für eine Serumgegenprobe mit den 4 genannten Testzellen müssen herkömmlicherweise 4 Ansätze pipettiert werden.

15 Für die Suche nach irregulären Antikörpern werden bekanntermaßen Panel bestehend aus normalerweise 2 oder 3 Blutgruppe 0-Zellen verwendet, deren kombiniertes Antigenprofil die wichtigsten Antigene, insbesondere der Blutgruppensysteme Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, P, Lewis, Lutheran enthält. Das Zellreagenz wird mit dem Serum oder Plasma der zu testenden Person zusammengebracht, 20 inkubiert und nach einem Zentrifugationsschritt visuell bzw. mit optischen Methoden auf eine eventuelle Agglutination der Erythrozyten überprüft. Für die Bestimmung einer Patientenprobe müssen 2 bis 3 Ansätze pipettiert werden.

25 Für die Identifikation der irregulären Antikörper, die in der Regel nach einem positiven Antikörper-Suchtest erfolgt, werden Panel bestehend aus bis zu 16 Blutgruppe 0-Zellen verwendet, deren Antigenprofile die wichtigsten Antigene, insbesondere der Blutgruppensysteme Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, P, Lewis, Lutheran, in genau abgestimmter Weise abdecken. Das Zellreagenz wird mit dem Serum oder Plasma der zu testenden Person zusammengebracht, inkubiert und visuell 30 bzw. mit optischen Methoden auf eine eventuelle Agglutination der Erythro-

zyten überprüft. Für die Bestimmung einer Patientenprobe müssen bis zu 16 Ansätze pipettiert werden.

Da die meisten transfusionsrelevanten irregulären Antikörper vom IgG-Typ und deshalb inkomplett sind, müssen die für die Antikörpersuche und-identifikation beschriebenen Reaktionen in der Regel verstärkt werden, um den Endpunkt Hämagglutination nachweisen zu können. Gebräuchlichstes Reagenz ist hierbei ein polyklonales anti-Humanglobulin-Antikörperreagenz, dem häufig anti-Komplement Antikörper zugesetzt sind (typischerweise anti-C3d und/oder anti-C3b).

Eine gebräuchliche Methode zum Nachweis von Thrombozyten-Antikörpern ist der sogenannte MAIPA-Test (Monoclonal Antibody Immobilisation of Platelet Antigenes). Hierbei werden Test-Thrombozyten mit dem zu testenden Serum inkubiert. Nach einem Waschschrift wird mit einem monoklonalen z. B. Maus-Antikörper, der für ein bestimmtes Thrombozyten-Glykoprotein spezifisch ist, inkubiert. Die Thrombozyten werden daraufhin lysiert und das verdünnte Lysat wird in ein mit z. B. Ziege anti-Maus Antikörpern beschichtetes Reaktionsgefäß einer Mikrotiterplatte gegeben. Der Ziege anti-Maus Antikörper bindet den Maus-Antikörper und den daran befindlichen Thrombozytenglykoprotein-Humanantikörper-Komplex. Der humane Antikörper wird durch Zugabe eines Enzym konjugierten Ziege anti-human IgG nachgewiesen.

Mit herkömmlichen diagnostischen Tests können nur entweder zelluläre oder plasmatische Parameter bestimmt werden. Zur Bestimmung von Blutbestandteilen müssen grundsätzlich zuvor Zellen und Plasma getrennt werden.

Lateral-Fluss-Tests finden heute vielfach Anwendung als Schnelltests, z. B. als Schwangerschaftstests, zur Bestimmung von Infektionsmarkern oder als Drogen-screens. Eine Lateral-Fluss-Test Anordnung besteht bekanntermaßen aus einem festen Träger, auf dem eine Aufgabebzone für die zu untersuchende Probe aufgebracht ist, eine Trennmembran, auf der Bindungselemente, z. B. Fängerantikörper

bzw. -antigene gebunden sind und auf der sich Bindungsreaktionen nachweisen lassen und ein saugfähiger Absorptionsbereich, der die zu untersuchende Probe linear durch die Trennmembran fließen lässt.

Testmembranen herkömmlicher Lateral-Fluss-Tests werden in der Regel mit chromatographie-ähnlicher Auftrennung beschrieben. Der Analyt in der Probe bindet spezifisch an die in einer Membran befestigten Bindungselemente, die in der Regel in hintereinanderliegenden bzw. übereinanderstehenden Banden angeordnet als Indikatorzonen vorliegen. Der Bindungskomplex wird durch Indikatorpartikel sichtbar gemacht, welche in der Regel in einem Konjugat-Freisetzungspad eingetrocknet in der Anordnung bereits vorliegen. Das Konjugat-Freisetzungspad ist zwischen Aufgabebzone und Membran angebracht. Die vorbe-schichteten farbigen Indikatorpartikel sind beispielsweise mit einem gegen den gesuchten Analyten gerichteten Antikörper beschichtet.

Das übliche Lateral-Fluss-Test-Format ist das eines sogenannten „Sandwich-Assays“, bei dem sowohl die Indikatorzone als auch die Indikatorpartikel mit gegen den gesuchten Analyten gerichteten Liganden, normalerweise ein Antikörpern, belegt sind. Dabei ist der Ligand (Bindungselement) an die Membran immobilisiert. Das Detektor-Reagenz, normalerweise ein Antikörper, welcher an gefärbte Polystyrolpartikel oder kolloidale Metalle gebunden ist, ist im Konjugat-Freisetzungspad auswaschbar deponiert. Dieser Bindungskomplex dient als Indikatorpartikel. Nach Auftragen der zu untersuchenden Probe benetzt diese sehr schnell das Konjugat-Freisetzungspad, wodurch die Indikatorpartikel mobilisiert werden. Die Indikatorpartikel migrieren mit der Flüssigkeitsfront entlang der porösen Membran. Ein in der Probe befindlicher Analyt wird durch den Antikörper, der an das Indikatorpartikel gekoppelt ist, gebunden. Wenn die Probe die Indikatorzone passiert, wird der Analyt/Indikatorpartikel-Komplex in der Indikatorzone durch Reaktion des Analyten mit dem in der Indikatorzone gebundenen Antikörper immobilisiert, was zu einem sichtbaren Signal führt.

Ein weiteres bekanntes Testformat für kleine Analyten mit nur einer einzigen antigenen Determinante, die nicht gleichzeitig zwei Antikörper binden kann, ist der

sogenannte „Kompetitions-Assay“. Das an die Indikatorpartikel gebundene Detektor-Reagenz ist normalerweise ein dem Analyten identisches oder analoges Molekül. Die Indikatorpartikel sind im Konjugat-Freisetzungs-Pad deponiert. Die Indikatorpartikel migrieren mit der Flüssigkeitsfront entlang der porösen Membran. Wenn die Probe, die Analyt enthält, und die Indikatorpartikel (die effektiv ebenfalls Analyt enthalten) die Indikatorzone passieren, bindet ein Teil der Analytmoleküle in der Probe und ein Teil der Indikatorpartikel. Je mehr Analyt sich in der Probe befindet, umso effektiver wird er mit der Bindung der Indikatorpartikel kompetieren, umso schwächer wird das Signal.

Bekanntermaßen sind diese Indikatorpartikel überwiegend aus kolloidalem Gold oder aus Polystyrol, die mit dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt und beschichtet werden. In den typischen Lateral-Fluss-Tests Formaten werden die Analyten indirekt bestimmt. Unter direkter Bestimmung eines Analyten wird hier verstanden, dass der Analyt bereits an das Indikatorpartikel (z. B. Erythrozyt) natürlich gebunden ist. In dem gebräuchlicheren Fall der indirekten Bestimmung des Analyten enthält die zu testende Probe in der Regel eine nicht zellulär gebundene, z. B. plasmatische Komponente als Analyten und es werden neben der zu testenden Probe zwei Reagenz-Komponenten benötigt, nämlich Indikatorpartikel und Bindungselement. Bei der indirekten Bestimmung bindet der Analyt zunächst an die aus dem Konjugat-Freisetzungs-Pad herausgelösten Indikator-Partikel, bevor dieser Komplex dann durch eine zweite Reaktion mit dem Bindungselement in den Indikatorzonen immobilisiert wird.

Bei der Verwendung herkömmlicher Lateral-Fluss-Tests mit Erythrozyten als Indikatorpartikeln, die die zu bestimmenden Analyten, beispielsweise Blutgruppen-spezifische Antigene, gebunden haben, werden bislang in den Indikatorzonen Antikörper gegen korrespondierende Blutgruppenantigene als Bindungselemente in hintereinanderliegenden bzw. übereinanderstehenden Banden nur einer Fließspur angeordnet, wie zum Beispiel anti-A, anti-B gegen die Blutgruppen-Antigene

A bzw. B oder Antikörper gegen Antigene des Rh Blutgruppensystems. Dabei weisen herkömmliche Lateral-Fluss-Tests den Nachteil auf, dass die an die Antikörper gebundenen Erythrozyten eine Flussbarriere für die weiter zu untersuchenden Analyte, beispielsweise weitere Zell-assoziierte Antigene, in einer Probe bilden. Durch Agglutination oder Adsorption von Zellen in einer proximal zur Aufgabezone liegenden Bande von Bindungselementen können sich weitere Analyten, insbesondere Zellen bzw. Zellfragmente, in der zu untersuchenden Probe nicht weiter ungehemmt und sichtbar auftrennen und können folglich nicht eindeutig bzw. vollständig nachgewiesen werden. Dies kann z. B. bei einer Person, die Blutgruppe AB Rh D positiv ist, zu einer Abschwächung bzw. Eliminierung der B- und der D-Bande führen, was zu einer Fehlinterpretation im Sinne von Blutgruppe A Rh negativ führen könnte. Bislang konnten deshalb speziell in der blutgruppenserologischen Diagnostik keine Lateral-Fluss-Test mit mehr als einer Indikatorzone angewendet werden. Für die Messung mehrerer, insbesondere zellulärer und plasmatischer Blutgruppenparameter müssen bislang Einzelparameter-Tests separat durchgeführt werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, die im Hinblick auf den Stand der Technik angeführten Nachteile, insbesondere die der hintereinanderliegenden bzw. überlagerten Indikator- bzw. Nachweiszonen herkömmlicher Lateral-Fluss-Tests, für eine gleichzeitige Messung verschiedener Proben-Parameter, insbesondere von zellulären und plasmatischen Parametern, zu überwinden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst zum einen durch eine Vorrichtung zum gleichzeitigen, qualitativen oder quantitativen Bestimmen eines oder mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe oder mehrerer flüssiger Proben, die eine Membran umfasst mit einer Aufgabezone zum Auftragen der flüssigen Probe, mindestens zwei Indikatorzonen, die mit den/dem Analyten bzw. mit denen Analyten in Wechselwirkung treten können und mindestens einem Absorptionsbereich, welcher die Flüssigkeit nach Passieren der Indikatorzonen aufnimmt, wobei die Indi-

katorzonen zwischen der Aufgabezone und einem Absorptionsbereich liegen, dadurch gekennzeichnet, dass die Fließrichtungen von der Aufgabezone durch die jeweiligen Indikatorzonen zu einem Absorptionsbereich, welche Fließspuren darstellen, im Wesentlichen parallel sind und mindestens zwei unterschiedliche
5 Fließspuren vorliegen.

Die Indikatorzonen der erfindungsgemäßen Vorrichtung befinden sich auf der Membran und umfassen Bindungselemente, die die zu bestimmenden Analyte in der Probe abfangen bzw. binden. In den Indikatorzonen werden die Bindungsreaktionen zwischen Analyt und Bindungselement nachgewiesen. Als besonders
10 bevorzugte Bindungselemente werden Antikörper bzw. Antikörperfragmente, Lektine bzw. Fragmente davon, Antigene bzw. Antigen-Epitope und/oder Zellen bzw. Zellfragmente an der porösen Membran angebracht. Die Indikatorzonen umfassen vorzugsweise jeweils ein Bindungselement gegen einen zu untersuchenden
15 Analyten.

In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Indikatorzonen so angeordnet, dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur nicht mehr als eine Indikatorzone durchströmt. Beispielhaft sind die Indikatorzonen versetzt auf der Membran angeordnet.
20 Die Anordnung der Indikatorzonen ist dabei vorzugsweise in einer von proximal nach distal oder umgekehrt diagonal verlaufenden Reihe ausgestaltet. Besondere Ausführungsformen sind V-förmig, W-, M-, oder N-förmig oder umgekehrt V-förmig, W-, M-, oder N-förmig ausgestaltet. In einer weiteren Ausführungsform sind die Indikatorzonen parallel nebeneinander versetzt in einer linearen Reihe angeordnet.
25

Die Einführung versetzter Indikatorzonen macht eine Multiparametertestung mit Erythrozyten als Indikatorpartikeln in einer lateralen Anordnung erst möglich. Die besonders bevorzugte Ausführungsform einer diagonalen Anordnung hat den Vorteil, dass die Bezeichnung der Ergebnisse besonders praktisch und leicht ablesbar auf die erfindungsgemäße Anordnung aufgebracht werden kann, da jeder
30 nachzuweisende Parameter eine definierte X- und Y-Position aufweist, betrachtet

man die Anordnung der erfindungsgemäßen Vorrichtung als ein Koordinatensystem mit Ordinate (Ebene der Fließrichtung) und Abszisse (Ebene der Auftragszone).

5 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind mehr als eine solche Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise jeweils von proximal nach distal oder umgekehrt diagonal verlaufend, oder beispielsweise auch V-förmig, W-, M-, oder N-förmig oder umgekehrt V-förmig, W-, M-, oder N-förmig verlaufend, in Fließrichtung hintereinander und/oder seitlich versetzt angeordnet und die Indikatorzo-
10 nen der verschiedenen Reihen entweder zueinander auf Lücke angeordnet, so dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur nicht mehr als eine Indikatorzone durchströmt, oder zueinander nicht auf Lücke angeordnet, so dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur mehr als eine Indikatorzone durchströmt.

Mehr als eine solche Reihe von Indikatorzonen, beispielsweise zwei Reihen von
15 Indikatorzonen, mit unterschiedlicher Distanz zur Aufgabezone sind insbesondere dann vorteilhaft, wenn aus einer Vollblutprobe zelluläre und plasmatische Parameter bestimmt werden sollen. In einer Ausführungsform, beispielhaft in einem Testansatz mit Vollblut als Probe, werden die Bindungselemente so gewählt, dass die im Plasma enthaltenen Analyten, zum Beispiel jede Art von Antikörpern, die
20 durch die Vorrichtung von der Aufgabezone zum Absorptionsbereich durch die Indikatorzonen fließen, in der proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen an die Bindungselemente binden. Die Bindungselemente zum Nachweis der zellulär gebundenen Analyten, beispielsweise erythrozytäre Antigene, werden dagegen so gewählt, dass diese in der distal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen an die Bindungselemente binden. Bei dieser
25 bevorzugten Ausführungsform wird vorzugsweise mit einer zusätzlich zu den Erythrozyten weiteren Sorte von Indikatorpartikeln, vorzugsweise aus kolloidalem Gold oder Polystyrol, gearbeitet. Diese Indikatorpartikel werden insbesondere eingesetzt, um nicht erythrozytär gebundene Analyten, beispielsweise frei im
30 Plasma vorkommende Antikörper, im Bindungskomplex in einer Indikatorzone sichtbar zu machen. Werden beispielhaft zwei Arten von Indikatorpartikeln ver-

wendet, wovon eine nicht Erythrozyten sind, können die Indikatorzonen der beiden Reihen zueinander nicht auf Lücke bzw. in einer Fließspur hintereinander angeordnet sein. Vorteilhaft ist hierbei die Anordnung, bei der die aus dem Plasma nachgewiesenen Analyten in den proximalen Indikatorzonen nachgewiesen werden und bei der die Erythrozyten-gebundenen Analyten in den distalen Indikatorzonen nachgewiesen werden. Eine Ausführungsform der Erfindung mit mehr als einer, wie vorbeschriebenen Reihe von Indikatorzonen, von denen die Bindungselemente jeder Reihe mit Erythrozyten als Indikatorpartikel reagieren bzw. binden, sind die Reihen von Indikatorzonen zueinander auf Lücke bzw. in einer Fließspur nicht hintereinander angeordnet.

Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird ein Lateral-Fluss-Test, insbesondere für die blutgruppenserologische Diagnostik, bereitgestellt, mit dem Erythrozyten als Indikatorpartikel verwendet werden und in einem Testansatz gleichzeitig mehrere zelluläre Parameter, insbesondere erythrozytäre Antigene bzw. Antigen-Epitope, plasmatische Parameter und/oder Blutzelleigenschaften, insbesondere aus Vollblutbestandteilen, pro zu untersuchender Probe bestimmt werden können. Des weiteren wird damit ein möglichst einfach herzustellendes und einfach, insbesondere mit wenigen Versuchsreihen und ohne Probenvorbereitung, zu handhabendes und kostengünstiges Testsystem bereitgestellt, mit dem gleichzeitig verschiedene zelluläre Parameter und/oder plasmatische Parameter einer Probe oder mehrerer zu untersuchender Proben bestimmt werden können.

Diese Vorteile bietet die erfindungsgemäße Vorrichtung auf jedem medizinisch-diagnostischen Gebiet, bei dem gleichzeitig verschiedene zelluläre Parameter und plasmatische Parameter bestimmt werden sollen, insbesondere auch auf dem Gebiet der Blutgruppen- und Infektionsserologie, insbesondere für jegliche Diagnostik im Rahmen der Transfusionsmedizin, z. B. zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung, wobei insbesondere Erythrozyten-gebundene Antigene bzw. Antigen-Epitope bestimmt werden, und Serumgegenprobe, wobei insbesondere reguläre Antikörper (Isoagglutinine) bestimmt werden, und/oder Antikörper-such-Test, wobei insbesondere irreguläre Antikörper bestimmt werden, sowie zur

simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung transfusionsrelevanter infektionsserologischer Marker, beispielhaft Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, HCV, *Treponema pallidum*, sowie das Oberflächen-Antigen des Hepatitis B Virus (HbsAg), sowie zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung von Antikörpern gegen andere Blutzellen als Erythrozyten, insbesondere anti-thrombozytäre und anti-lymphozytäre Antikörper.

Hierzu kann antikoaguliertes oder natives Vollblut verwendet werden, bei dem vor der Bestimmung nicht in aufwendiger Weise Erythrozyten und Serum- bzw. Plasma-Fraktion von einander separiert werden müssen. Die Bestimmung kann in einem manuellen Format erfolgen, das komplett ohne Geräte (inklusive elektrischen Strom) auskommt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfassen die Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen, Antikörper bzw. Antikörperfragmente und/oder Lektine bzw. Fragmente davon, die die zu bestimmenden Blutgruppenantigene aller denkbaren Blutgruppensysteme und damit die sie tragenden Zellen in der Probe abfangen bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden Antikörper bzw. Antikörperfragmente und/oder Lektine bzw. Fragmente davon gegen Antigene oder Antigen-Epitope, insbesondere der Blutgruppensysteme AB0, Rh und Kell, beispielhaft anti-A, anti-B, anti-D und anti-K, in den Indikatorzonen an der porösen Membran, vorzugsweise in einer distal zu anderen Indikatorzonenreihen angeordneten Reihe, angebracht.

Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe gelegenen Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das den Durchfluss der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-Bindungselement ist vorzugsweise ein polyklonaler anti-Erythrozyten-Antikörper.

Diese bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst in einer weiteren, vorzugsweise proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen Antigene bzw. Antigen-Epitope, die reguläre Antikörper in der Probe abfangen bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden dafür
5 A1, A2, B, 0 Blutgruppenantigene bzw. -antigen-Epitope, beispielsweise Erythrozytenmembranen von Erythrozyten definierter Blutgruppen (A1, A2, B, 0) oder synthetisch hergestellte Blutgruppensubstanzen, an der porösen Membran angebracht. Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe
10 gelegenen Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das den Durchfluss der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-Bindungselement ist vorzugsweise ein anti-IgG Antikörper.

Diese bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann in
15 einer weiteren, vorzugsweise proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen Antigene bzw. Antigen-Epitope umfassen, die irreguläre Antikörper bzw. Fragmente davon in der Probe abfangen bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden dafür die Zellmembranen verschiedener Blutgruppe 0 Erythrozyten-Präparationen, deren kombiniertes Antigenprofil diejenigen Antigene
20 abdeckt, die gegen die wichtigsten Transfusions-relevanten irregulären Antikörper gerichtet sind, an der porösen Membran angebracht. Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe gelegenen Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das den Durchfluss der Probe
25 durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-Bindungselement ist vorzugsweise ein anti-IgG Antikörper.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfassen die Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen, Antikörper bzw. Antikörperfragmente und/oder Lektine bzw. Fragmente davon, die die bei der Blutgruppenbe-
30

stimmung zu bestimmenden Blutgruppenantigene und damit die sie tragenden Zellen in der Probe abfangen bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden Antikörper bzw. Antikörperfragmente und/oder Lektine bzw. Fragmente davon gegen Antigene oder Antigen-Epitope des AB0-Blutgruppensystems, beispielhaft anti-A, anti-B, anti-A und anti-B, in den Indikatorzonen an der porösen Membran, vorzugsweise in einer distal zur Aufgabezone und zu anderen Indikatorzonenreihen angeordneten Reihe, angebracht.

Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe gelegenen Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das den Durchfluss der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-Bindungselement ist vorzugsweise ein polyklonaler anti-Erythrozyten-Antikörper.

Diese bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst in einer weiteren, vorzugsweise proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen Thrombozyten- und/oder Lymphozytenmembranen bzw. Membranbestandteile als Bindungselemente zum Nachweis von anti-thrombozytären/lymphozytären Antikörpern.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfassen die Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen, Antikörper bzw. Antikörperfragmente und/oder Lektine bzw. Fragmente davon, die die bei der Blutgruppenbestimmung zu bestimmenden Blutgruppenantigene und damit die sie tragenden Zellen in der Probe abfangen bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden Antikörper bzw. Antikörperfragmente und/oder Lektine bzw. Fragmente davon gegen Antigene oder Antigen-Epitope des AB0-Blutgruppensystems, beispielhaft anti-A, anti-B, anti-A und anti-B, in den Indikatorzonen an der porösen Membran, vorzugsweise in einer distal zur Aufgabezone und zu anderen Indikatorzonenreihen angeordneten Reihe, angebracht.

Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe gelegenen Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das den Durchfluss der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-Bindungselement ist vorzugsweise ein polyklonaler anti-Erythrozyten-Antikörper.

Diese bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst in einer weiteren, vorzugsweise proximal zur Aufgabzone angeordneten Reihe von Indikatorzonen Bindungselemente zum Nachweis von infektiösen Agenzien, insbesondere synthetisch hergestellte Peptide oder mit rekombinanten DNA-Methoden exprimierte rekombinante Antigene, die diagnostisch bedeutsame Sequenzen von Oberflächenproteinen der jeweiligen Marker umfassen (Antikörper-Nachweis), oder Antikörper, welche gegen (Oberflächen-)Proteine infektiöser Agenzien gerichtet sind (Antigen-Nachweis).

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst eine in der Mitte der Membran angeordnete Aufgabzone und zwei Absorptionsbereiche und zwei jeweils zwischen Aufgabzone und einem Absorptionsbereich angeordnete Indikatorzonenbereiche, so dass die Probe bidirektional von der Aufgabzone zu den Absorptionsbereichen fließt.

Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung muss für die gleichzeitige Bestimmung von zellulären und plasmatischen Parametern aus einer Probe nicht mehr für jede einzelne Bestimmung separat pipettiert werden, sondern an einer Probe können gleichzeitig sämtliche gewünschten Parameter bestimmt werden, insbesondere bei der simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörpersuch-Test sowie bei der simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung transfusionsrelevanter infektionsserologischer Marker, wobei die Blutgruppenbestimmung mit dem Nachweis jeglicher

infektionsserologischer Marker kombiniert werden kann, sowie bei der simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung von Antikörpern gegen andere Blutzellen als Erythrozyten, insbesondere anti-Thrombozyten und anti-Lymphozyten Antikörper.

- 5 Dies stellt eine außerordentliche Rationalisierung der Arbeitsabläufe dar. Neben dem Vorteil der Simultanbestimmung vieler serologischer Parameter ist hier der praktisch vollständige Wegfall der Probenvorbereitung im Vergleich zu herkömmlichen Tests zu nennen. Auch die Ablesung der in diagonaler Anordnung dargestellten Ergebnisse ist wesentlich günstiger. So lassen sich in der erfindungsgemäßen Vorrichtung beispielsweise Blutgruppen-, insbesondere AB0-Eigenschaften und Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test, oder Blutgruppen-, insbesondere AB0-Eigenschaften und andere immunhämatologische Parameter, insbesondere anti-thrombozytäre und/oder anti-lymphozytäre Antikörper bzw. Fragmente davon, oder Blutgruppen-, insbesondere AB0-Eigenschaften und
- 10 infektionsserologische Marker, insbesondere Antikörper gegen bakterielle und/oder virale Agenzien bzw. Fragmente davon oder virale oder bakterielle Antigene bzw. -Epitope in einer Vorrichtung nebeneinander bestimmen und ablesen.
- 15

- Das zweidimensionale, flächige Ergebnis sowie der stabile Endpunkt der Reaktion begünstigen sowohl die Ablesung mit dem bloßen Auge als auch eine automatisierte Ablesung der Ergebnisse mit gängigen Bildanalyseverfahren, wie z. B. CCD-Kameras. Der Arbeitsaufwand ist vermindert, selbst bei manueller Abarbeitung. Die erfindungsgemäße Vorrichtung führt zudem zu einer Reduktion der Umweltbelastung und zu kostengünstigen Effekten. Selbst in Notsituationen mit Zeitdruck kann in kurzer Zeit in einer einzigen Versuchsanordnung beispielsweise
- 20 eine komplette AB0-Blutgruppenbestimmung mit Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test nach irregulären Antikörpern durchgeführt werden, beispielsweise eine komplette AB0-Blutgruppenbestimmung mit infektionsserologischen Marker-Bestimmung oder anti-Thrombozyten/Lymphozyten Antikörper-Bestimmung durchgeführt werden.
- 25

Produktionstechnisch hat der Lateral-Diagonal-Fluss-Aufbau wesentliche Vorteile gegenüber dem Stand der Technik, indem es zu einem erheblich geringeren Verbrauch der verwendeten Reagenzien kommt und durch die Bereitstellung einer Vielzahl von Testparametern, welche bisher separat getestet werden müssen, in
5 einer einzigen Vorrichtung.

Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird ein Lateral-Fluss-Test, insbesondere für die immunhämatologische und infektionsserologische Diagnostik, bereitgestellt, mit dem in einem Testansatz gleichzeitig mehrere zelluläre, insbesondere
10 erythrozytäre Antigene bzw. Antigen-Epitope, plasmatische Parameter und/oder Blutzelleigenschaften, insbesondere aus Vollblutbestandteilen, pro zu untersuchender Probe bestimmt werden können, wobei mindestens zwei Sorten von Indikatorpartikeln, von denen mindestens eine Sorte Erythrozyten sind, verwendet werden. Des weiteren wird damit ein möglichst einfach herzustellendes und ein-
15 fach, insbesondere mit wenigen Versuchsreihen und ohne Probenvorbereitung, zu handhabendes und kostengünstiges Testsystem bereitgestellt, mit dem gleichzeitig verschiedene zelluläre Parameter und/oder plasmatische Parameter einer Probe, insbesondere Blutgruppenmerkmale, Nachweis regulärer und irregulärer Antikörper, Antikörper gegen Thrombozyten und/oder Lymphozyten und/oder infektions-
20 serologischer Marker, insbesondere solcher mit transfusionsmedizinischer Relevanz, bestimmt werden können.

Die Membran der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist eine poröse Membran. Bevorzugte Membran-Materialien sind beispielsweise Nitrozellulose (z. B. *UniSart* von Sartorius, *HiFlow* von Millipore, Whatman, *AE99* bzw. *FF85/100* von Schleicher & Schuell), Polyethylen (*Lateral Flo* von Porex Corporation) oder Nylon (*Novylon* von CUNO). Vorzugsweise weist die Membran eine möglichst große Porengröße auf, da eine hohe Porosität der Membran das Eindringen insbe-
25 sondere von zellulären Komponenten der zu bestimmenden Probe, z. B. von
30

Erythrozyten, in die poröse Struktur begünstigt. Von besonderem Vorteil ist der Einsatz aufnehmender Membranen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist jedoch nicht auf diese Eigenschaften beschränkt. Bevorzugt werden alle Membranen mit einer hohen kapillaren Flussrate (Capillary Speed), wobei die kapillare Flussrate die Zeit ist, die eine Farblösung braucht, um 40 mm auf einer gegebenen Membran zurückzulegen. Besonders bevorzugt sind Membranen, deren kapillare Flussrate < 100 ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist in Fließrichtung hinter der Aufgabezone der erfindungsgemäßen Vorrichtung und vor den Indikatorzonen auf der porösen Membran ein Dichtelement angeordnet. Zur Anwendung kommen zwei- oder dreidimensionale Dichtelemente, die auf der porösen Membran platziert werden und mit denen eine von der übrigen Fläche der porösen Membran separierte Probenauftragszone geschaffen wird. Das Dichtelement hat erfindungsgemäß primär die Wirkung einer Flüssigkeitsbarriere und erlaubt die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran. Weiterhin dichtet das Dichtelement erfindungsgemäß die Probenauftragszone ab zur Verhinderung eines unerwünschten Flüssigkeitsübertritts in die anderen Bereiche der Lateral-Fluss-Vorrichtungsanordnung.

Bevorzugte Ausführungsformen des Dichtelementes sind die Steg- oder Trog- bzw. Trichter-Form. Die Ausformung des Dichtelementes erfolgt durch Schneideprozesse aus dem zur Herstellung des Dichtelementes verwendeten Material. Im Fall der Trichter- bzw. Trogform erhält das Dichtelement eine innere Öffnung, deren bevorzugte Ausführungsvarianten runde, quadratische oder rechteckige, im Fall der Trichterform sich zur Unterseite (Membrankontaktseite) des Dichtelementes verjüngende Formen sind.

Bevorzugte Materialien für das Dichtelement sind Materialien, die nicht wasser-aufnehmend (hydrophob) sind. In einer besonderen Ausführungsform sind die Materialien einseitig mit einem Klebstofffilm, beispielsweise einem drucksensiti-

ven bzw. selbsthaftenden Acrylatklebstoff, beschichtet. Somit kann das Dichte-
ment direkt auf die Oberfläche der porösen Membran geklebt werden. Alternativ
kann das Dichtelement mit dem Lateral-Fluss-Gehäuse verbunden, beispielsweise
verklebt sein, wobei in dieser Ausführungsform das Lateral-Fluss-Gehäuse das
5 Dichtelement auf die Oberfläche der porösen Membran drückt und damit die
Funktionen des Dichtelementes erzielt werden.

Bevorzugte Materialien für die Ausbildung von zweidimensionalen Dichte-
menten sind jede Form von Klebebändern oder Klebefolien (z. B. Tesa 4124 von
Beiersdorf AG, ARcare 7815 von Adhesives Research).

10 Bevorzugte Materialien für die Ausbildung von dreidimensionalen Dichtelemen-
ten sind flexible, geschlossenporige Elastomermaterialien oder flexible Silikon-
materialien mit unterschiedlichen Materialstärken, vorzugsweise 3-5 mm (z. B.
Zellkautschuk EPDM140 von Pitzner, Silikonkautschuk oder Vollkautschuk,
Härte 40° oder weniger, von Castan).

15 Durch diese erfindungsgemäße Ausgestaltung ist die erfindungsgemäße Vorrich-
tung in der Lage, flüssige Proben, die Zellen enthalten, wie beispielsweise Voll-
blut, aufzunehmen, ohne die Zellen dabei abzufiltern. Weiterhin erlaubt das
Dichtelement das Auftragen großer Probenvolumina auf die poröse Membran
(Aufgabezone), ohne dass diese überschwemmt wird. Somit unterstützt das Dich-
20 telement die Nutzung der aufnehmenden Eigenschaften der porösen Membran.
Weiter garantiert das Dichtelement einen gerichteten Probenfluss. Die erfin-
dungsgemäße Vorrichtung kann jedoch mit oder ohne Dichtelement gut funk-
tionieren.

25 Für den Absorptionsbereich (Absorptions-Pad) der erfindungsgemäßen Vorrich-
tung werden mechanisch stabile Materialien bevorzugt, vorzugsweise mit Was-
serabsorptionskapazitäten von 20-30 g/100 cm² (z. B. Wicking Papier, Typ 300,
Schleicher und Schüll). Der Kontakt zwischen dem Absorptions-Pad und der La-
teral Fluss-Membran der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird durch Andruck
30 und Überlappung mit der porösen Membran hergestellt. Die genaue Positionie-

rung des Absorptions-Pads auf der Membran wird durch Verkleben des Absorptions-Pads mit der, die Lateral Fluss-Membran tragenden Trägerschicht (backing sheet), erzielt.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform sind die Komponenten der erfindungsgemä-
ßen Vorrichtung zum Zwecke der mechanischen Verstärkung auf eine Unterlage
bzw. Trägerschicht aufgebracht. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann jedoch
mit oder ohne Trägerschicht funktionieren. Bevorzugt werden mechanisch stabile
und nicht wasseraufnehmende Materialien, vorzugsweise mit Materialstärken von
10 100 µm oder mehr, die ein- oder zweiseitig mit einem Klebstofffilm, z. B. einem
drucksensitiven bzw. selbsthaftenden Acrylatklebstoff, beschichtet sind (z.B.
0.005'' Polyester W/ GL-187, G & L). Auf der Trägerschicht werden die poröse
Membran und das Absorptions-Pad fixiert. Im Fall der doppelseitig klebenden
Trägerschicht wird die klebende zweite Seite zur Fixierung des Stapels auf weite-
15 ren Flächen, z. B. innerhalb der Lateral-Fluss-Gehäuse, eingesetzt.

- In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Vorrichtung, entwe-
der mit oder ohne Trägerschicht, auf der die Komponenten der erfindungsgemä-
ßen Vorrichtung aufgebracht sind, in einem Gehäuse integriert, wodurch die
20 Membran-Komponenten aneinander gedrückt werden und das Gehäuse die Dich-
telementfunktion unterstützt. Dabei kann die erfindungsgemäße Vorrichtung je-
doch mit oder ohne Gehäuse genauso gut funktionieren.

- 25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemä-
ßen Vorrichtung zur Analyse von Blut, insbesondere zur simultanen Durchfüh-
rung der Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörper-
such-Test und/oder zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung
und des Nachweises von Antikörpern gegen infektiöse, insbesondere bakterielle
30 und/oder virale Agenzien bzw. Fragmenten davon oder von Antigenen infektiöser

Agenzien und/oder zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und des Nachweises von Antikörpern gegen andere Blutzellen als Erythrozyten, insbesondere anti-thrombozytärer oder anti-lymphozytärer Antikörper, bzw. Fragmenten davon.

5

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst zum anderen durch ein Verfahren zur Bestimmung mehrerer Analyten oder deren Derivaten in einer flüssigen Probe, welches das Auftragen der Probe auf die Aufgabezone einer Membran der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst, wobei diese Probe in ausreichender Menge vorliegt, um die Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in Richtung Absorptionsbereich durch die Indikatorzonen zu fließen und um die Analyten oder ihre Derivate in der Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, an die jeweiligen Indikatorzonen zu binden bzw. in den Indikatorzonen einen Komplex zu bilden.

15

Eine besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt simultan eine Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörper-such-Test durch.

Beispielhaft wird Vollblut oder eine Verdünnung davon auf die Aufgabezone der Vorrichtung aufgetragen. Alle Komponenten dringen, geführt durch das Dichtelement, in die poröse Membran ein und passieren bei der Migration in Richtung Absorptions-Pad zunächst den Indikatorzonenbereich für die Serumgegenprobe, der Fragmente der Zellen A1, A2, B, 0 umfasst sowie die Kontroll-Indikatorzone mit anti-IgG/IgM. Die im Serum vorhandenen Isoagglutinine binden an die korrespondierenden zellulär gebundenen Antigene. Serum-IgG bindet an das Kontrollbindungselement (Serumgegenprobe-Sensibilisierung).

Die zellulär gebundenen Antigene migrieren weiter in den distal zum Indikatorzonenbereich Serumgegenprobe angeordneten Indikatorzonenbereich für die Blutgruppenbestimmung, in dem in jeder Indikatorzone ein Antikörper gegen ein anderes Blutgruppenmerkmal immobilisiert ist (z. B. anti-A, anti-B, anti-AB). Die zur Aufgabezone distalste Indikatorzone dieses Bereichs hat beispielhaft polyklo-

30

nale anti-Erythrozyten-Antikörper als Bindungselement. In diesem Indikatorzonenbereich binden die Erythrozyten an die Bindungselemente, die zu den jeweiligen Blutgruppenmerkmalen korrespondieren. An das Kontrollbindeelement binden Erythrozyten jedweder Blutgruppe (Blutgruppenbestimmung).

5 In einem folgenden Waschschrift wird ungebundenes Material aus der Membran ausgewaschen. Im nachfolgenden Detektionsschritt werden mit Hilfe von synthetischen Partikeln, welche mit anti-IgG/IgM beschichtet sind, die an den Bindungselementen der proximalen Reihe von Indikatorzonen immobilisierten Isoagglutinine und Kontrollantikörper sichtbar gemacht (Serumgegenprobe-Detektion).

10

Eine weitere besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt simultan eine Blutgruppenbestimmung und eine Bestimmung von anti-Thrombozyten und/oder anti-Lymphozyten Antikörper bzw. Fragmenten davon durch.

15

Beispielhaft umfassen für die Bestimmung der anti-thrombozytären Antikörper die Indikatorzonen im zur Aufgabebzone proximalen Bereich Thrombozytenfragmente als Bindungselemente, an die –falls in der Probe vorhanden- im Serum enthaltene anti-thrombozytäre Antikörper binden. Das übrige Verfahren ist wie in der vorstehenden Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben, insbesondere erfolgt die Blutgruppenbestimmung wie dort beschrieben.

20

Eine weitere besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt simultan eine Blutgruppenbestimmung und eine Bestimmung transfusionsrelevanter infektionsserologischer Marker durch.

25

Beispielhaft umfassen für die Bestimmung von Infektionsmarkern die Indikatorzonen des ersten, proximalen Indikatorzonenbereichs als Bindungselemente synthetische Peptide und/oder rekombinante Proteine, die den Sequenzen von Proteinen viraler oder bakterieller Agenzien entsprechen, (Bestimmung von Antikörpern gegen Infektionsmarker, z. B. anti-HIV-1), sowie Antikörper, die gegen

30

Proteine von Infektionsmarkern gerichtet sind (Bestimmung von Antigenen, z. B. HbsAg). Im Serum enthaltene Antikörper bzw. Antigene binden im ersten Schritt an die korrespondierenden Antigene bzw. Antikörper. Das übrige Verfahren ist wie in der vorstehenden Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben, insbesondere erfolgt die Blutgruppenbestimmung wie dort beschrieben.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich bei den zu bestimmenden Analyten insbesondere um Blutgruppen-Antigene bzw. Antigen-Epitope, vorzugsweise solche der Blutgruppensysteme AB0, Rh, Kell, um gegen Blutgruppenantigene oder -antigen-Epitope gerichtete Antikörper bzw. Fragmente davon, vorzugsweise reguläre Antikörper, irreguläre Antikörper, um Antikörper gegen infektiöse Agenzien, um (Oberflächen-)Antigene infektiöser Agenzien und/oder um anti-thrombozytäre oder anti-lymphozytäre Antikörper bzw. Fragmente davon.

Die zu untersuchende Probe, beispielsweise natives oder antikoaguliertes Vollblut oder Erythrozytenkonzentrate oder verdünnte Erythrozyten-Suspensionen, Blutbestandteile oder Testflüssigkeiten, wie Kontrollserum oder Kontrollzellen, wird auf die Aufgabebzone der erfindungsgemäßen Vorrichtung aufgetragen. Die in der Probe enthaltenen Erythrozyten, die den/die Analyten tragen, dienen gleichzeitig als Indikatorpartikel.

Es werden insbesondere zwei Gruppen von Indikatorpartikeln verwendet. Die eine wird alleine durch Erythrozyten zum direkten Nachweis von Erythrozytengebundenen Analyten repräsentiert. Die andere Gruppe besteht aus Partikeln jeder denkbaren Art und Kombination, mit denen sich Bindungsreaktionen nachweisen lassen, vorzugsweise Partikel aus kolloidalem Gold oder aus Polystyrol. In einer bevorzugten Ausführungsform werden pro Testlauf verschiedene Indikatorpartikel verwendet, von denen mindestens eine Sorte Erythrozyten sind.

Im folgenden wird die Erfindung durch Figuren und Beispiele näher erläutert, ohne sie einzuschränken. Es zeigen:

- 5 Fig. 1 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe;




Fig. 2 eine Explosionsdarstellung der in Fig. 1 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests;

- 10 Fig. 3 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe, ausgeführt mit einem dreidimensionalen Dichtelement in Stegform;

- 15 Fig. 4 eine Explosionsdarstellung der in Fig. 3 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests;





Fig. 5 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe, ausgeführt mit einem dreidimensionalen Dichtelement in Trogform;


- 20 Fig. 6 eine Explosionsdarstellung der in Fig. 5 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests;

Fig. 7 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest für Empfänger;

5 Fig. 8 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest bei Spendern;

 Fig. 9 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und dem Nachweis von Infektionsmarkern;

10 Fig. 10 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und dem Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene.

 15 In Fig. 1 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, der porösen Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidimensionalen, in Stegform ausgeführten Dichte-
20 telement 4. Dabei ist die poröse Membran 2 auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso ist das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein Teil des Absorptions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 überlappt. Das auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierte Dichte-
25 telement 4 separiert die Aufgabebzone 5 von der übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testrea-

genzien in die poröse Membran 2. Zwischen der Aufgabzone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorptions-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6, angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I-IX gebildet, wobei die Indikatorzonen I-V den Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ und die Indikatorzonen VI-IX den Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
---------------	-----------------	---------------

Indikatorzonenbereich: Serumgegenprobe

I	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A1
II	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A2
III	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe B
IV	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0
V	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

VI	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
VII	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
VIII	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
IX	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone V ist die Kontrolle (ctl) für die Serumgegenprobe und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone IX ist die Kontrolle (ctl) für die Blut-

gruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen Indikatorzonen.

5 In Fig. 2 wird eine Explosionsdarstellung der in Fig. 1 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests gezeigt, die aus den Komponenten Trägerschicht 1, poröse Membran 2, Absorptions-Pad 3 und Dichtelement 4 besteht, welches die Aufgabezone 5 von der übrigen Membran separiert, die wiederum den Indikatorzonenbereich 6, bestehend aus den Indikatorzonenbereichen „Serumgegenprobe“ und „Blutgruppenbestimmung“ mit den diagonal versetzt angeordneten Indikatorzonen I-IX enthält.

10 In Fig. 3 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe gezeigt. Im vorliegenden Beispiel entsprechen die Komponenten der Vorrichtung den Komponenten der in Fig. 1 dargestellten Vorrichtung mit Ausnahme des auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierten, in dreidimensionaler Stegform ausgeführten Dichtelements 4.

20 In Fig. 4 wird eine Explosionsdarstellung der in Fig. 3 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests mit den Komponenten Trägerschicht 1, poröse Membran 2, Absorptions-Pad 3 und in dreidimensionaler Stegform ausgeführtes Dichtelement 4 gezeigt, welches die Aufgabezone 5 von der übrigen Membran separiert, die wiederum den Indikatorzonenbereich 6, bestehend aus den Indikatorzonenbereichen „Serumgegenprobe“ und „Blutgruppenbestimmung“ mit den diagonal versetzt angeordneten Indikatorzonen I-IX enthält.

25 In Fig. 5 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe gezeigt. Im vorliegenden Beispiel entsprechen die Komponenten der Vorrichtung den Komponenten der in Fig. 1

dargestellten Vorrichtung mit Ausnahme des auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierten, in dreidimensionaler Trogform ausgeführten Dichtelements 4.

In Fig. 6 wird eine Explosionsdarstellung der in Fig. 5 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests mit den Komponenten Trägerschicht 1, poröse Membran 2, Absorptions-Pad 3 und in dreidimensionaler Trogform ausgeführtes Dichtelement 4 gezeigt, welches die Aufgabezone 5 von der übrigen Membran separiert, die wiederum den Indikatorzonenbereich 6, bestehend aus den Indikatorzonenbereichen „Serumgegenprobe“ und „Blutgruppenbestimmung“ mit den diagonal versetzt angeordneten Indikatorzonen I-IX enthält.

10 In Fig. 7 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest bei Empfängern gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, der porösen Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidimensionalen, in Stegform ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse Membran 2 auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso ist das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein Teil des Absorptions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 überlappt. Das auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabezone 5 von der übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran 2. Zwischen der Aufgabezone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorptions-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6 angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I-XII gebildet, wobei die Indikatorzonen I-VIII den Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuchtest“ und die Indikatorzonen IX-XII den Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
---------------	-----------------	---------------

Indikatorzonenbereich: Serumgegenprobe/Antikörpersuche

I	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A1
II	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A2
III	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe B
IV	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0
V	Erythrozyten-Ghosts	Suchzelle 1, Blutgruppe 0, Rh-Formel $R_1R_1^w$
VI	Erythrozyten-Ghosts	Suchzelle 2, Blutgruppe 0, Rh-Formel R_2R_2
VII	Erythrozyten-Ghosts	Suchzelle 3, Blutgruppe 0, Rh-Formel R_1R_1
VIII	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

IX	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
X	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
XI	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
XII	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone VIII ist die Kontrolle (ctl) für die Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone XII ist die Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-

Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen Indikatorzonen.

In Fig. 8 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsge-
mäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von
5 Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest bei Blut-
spendern gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trä-
gerschicht 1, der porösen Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidi-
mensionalen, in Stegform ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse
Membran 2 auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trä-
10 gerschicht 1 fixiert. Ebenso ist das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fi-
xiert, wobei ein Teil des Absorptions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 über-
lappt. Das auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 sepa-
riert die Aufgabezone 5 von der übrigen Membranfläche und ermöglicht die ge-
richtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Mem-
15 bran 2. Zwischen der Aufgabezone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2,
der mit dem Absorptions-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6
angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-
Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I-X gebildet, wobei die
Indikatorzonen I-VI den Indikatorzonenbereich „Serumgegenpro-
20 be/Antikörpersuchtest“ und die Indikatorzonen VII-X den Indikatorzonenbereich
„Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgenden Bindungselementen
bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
---------------	-----------------	---------------

Indikatorzonenbereich: Serumgegenprobe/Antikörpersuche

I	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A1
II	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A2

III	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe B
IV	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0
V	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0, Pool der Suchzellen 1, 2, 3 (siehe Beschreibung Fig. 8)
VI	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

VII	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
VIII	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
IX	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
X	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone VI ist die Kontrolle (ctl) für die Serumgegenprobe und Antikörper-
suchtest und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone X ist die
Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-
Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen In-
dikatorzonen.

In Fig. 9 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsge-
mäßigen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von
Blutgruppenbestimmung und Nachweis von Infektionsmarkern gezeigt. Im vor-
liegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, der porösen
Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidimensionalen, in Stegform
ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse Membran 2 auf der mit einem
drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso ist
das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein Teil des Absorp-
tions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 überlappt. Das auf der Oberseite der po-
rösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabezone 5 von der

5 übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran 2. Zwischen der Aufgabezone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorptions-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6 angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I-XII gebildet, wobei die Indikatorzonen I-VI den Indikatorzonenbereich „Nachweis von Infektionsmarkern“ und die Indikatorzonen VII-XII den Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
---------------	-----------------	---------------

Indikatorzonenbereich: Nachweis von Infektionsmarkern

I	Synthetische Peptide	HIV-1 (gp-14, gp-41)
II	Synthetische Peptide	HIV-2 (gp-36)
III	Antikörper	Anti-HBsAg (monoklonal)
IV	Rekombinantes Antigen	HCV (C-100, C-200, C33c, C22)
V	Rekombinantes Antigen	Syphilis (TpN 15, TpN 17, TpN 47)
VI	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

VII	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
VIII	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
IX	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)

X	Antikörper	Anti-D (monoklonal)
XI	Antikörper	Anti-CDE (monoklonal)
XII	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone VI ist die Kontrolle (ctl) für die Bestimmung von Antikörpern gegen infektiöse Agenzien und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone XII ist die Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen Indikatorzonen.

In Fig. 10 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und dem Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene, gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, der porösen Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidimensionalen, in Stegform ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse Membran 2 auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso ist das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein Teil des Absorptions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 überlappt. Das auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabezone 5 von der übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran 2. Zwischen der Aufgabezone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorptions-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6 angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I-IX gebildet, wobei die Indikatorzonen I-III den Indikatorzonenbereich „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“ und die Indikatorzonen IV-IX den Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgenden Bindungsselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
---------------	-----------------	---------------

Indikatorzonenbereich: Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene

I	Membranproteine	Thrombozyten, HPA 1bb3aa5bb
II	Membranproteine	Thrombozyten, HPA 1aa3bb5aa
III	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

IV	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
V	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
VI	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
VII	Antikörper	Anti-D (monoklonal)
VIII	Antikörper	Anti-CDE (monoklonal)
IX	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone III ist die Kontrolle (ctl) für den Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone IX ist die Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen Indikatorzonen.

Beispiele

Beispiel 1: Simultane Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe

Herstellung der Teststreifen:

Die Teststreifen bestehen aus einer Aufgabezone, einem Indikatorzonenbereich und einem Absorptionsbereich. Membranen der Sorte Millipore HiFlow Plus 065 werden in Streifen auf eine Größe von 15 mm x 35 mm (Breite/Länge; x/y) zu-
rechtgeschnitten und auf eine Trägerschicht (Backing Sheet, z. B. von G&L) auf-
geklebt. Diagonal versetzt werden im Indikatorzonenbereich, der sich in die Indi-
katorzonenbereiche „Serumgegenprobe“ (proximal zur Aufgabezone angeordnet)
und Blutgruppenbestimmung (distal zur Aufgabezone angeordnet) aufteilt, je 0,2
µl Punkte der verschiedenen Bindungselemente unter Verwendung eines Dispen-
sers, z.B. AD3200 (Biodot) aufgetragen:

Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ – Suspensionen von Erythrozyten-
Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1, Blutgruppe A2, Blutgruppe B und Blut-
gruppe 0 (hergestellt aus Erythrozytenkonzentraten) sowie Anti-human IgG/IgM
Antikörper (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759)
als Kontrolle; Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ - Anti-A Anti-
körper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper – Klon ES-4
(Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper - Klone AB6, AB26, AB92 (Me-
dion Diagnostics, 010062); anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG Fraction of
anti Human RBC, Rockland, 209-4139).

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Serum-
gegenprobe“ startet mit Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1 in
Position x=2,5 mm/ y=10 mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend
in Abständen von x=2,5 mm/ y=1,5 mm zur Position der Erythrozyten-Ghosts der
Spezifikation Blutgruppe A1 dispensiert. Die Erythrozyten-Ghosts werden als 0.1-
0.5 %ige (v/v) Suspensionen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v)
Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper als 1:1 Gemisch in Konzentration
von 50 µg/ml in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dis-
pensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position $x=3\text{ mm}/y=20\text{ mm}$. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=3\text{ mm}/y=1,5\text{ mm}$ zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdün-

5 nungen der Antikörper erfolgen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.

Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Test-

10 durchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position $y=5\text{ mm}$ über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

15 Testansatz:

Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen Test werden 100 µl unverdünntes bzw. 1:3 oder 1:6 in Verdünnungspuffer (En-

20 lisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Aufgabezone aufgetragen. Wenn das Blut die Aufgabezone verlassen hat, wird zweimalig mit 100 µl EnlisstII gewaschen, um ungebundene Erythrozyten aus der Membran zu entfernen. Im Anschluß werden 50 µl anti-IgG/A/M konjugierte Goldpartikel (20 bis 40 nm, Arista Biologicals, CGIGA-0800, CGIGG-0800, CGIGM-0800), 1:10 (v/v) verdünnt in TBS, 0,08 % Gelatine, 0,5 % Albumin auf

25 die Aufgabezone aufgetragen. Anstelle der Goldpartikel können auch farbige, 100 bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet werden, z.B. von Merck Eurolab France/Estapor. Wenn die Goldpartikel die Aufgabezone verlassen haben, wird die Membran nochmals ein- oder zweimalig mit 100 µl EnlisstII gewaschen.

Ergebnis:

(a) Kontrollen: Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone IX, Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone V, Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“) charakteristisch purpurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist.

(b) Testergebnisse: Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen im Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ rote Punkte (positiv) oder die fast weisse Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Die korrespondierenden Isoagglutinine sind im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel als purpurfarbene Punkte oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar. Bei Abwesenheit eines Isoagglutinins sind keine sich vom Hintergrund unterscheidenden Signale in diesen Positionen zu erkennen.

Beispiel 2: Simultane Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test bei Empfängern

Herstellung der Teststreifen:

Die Teststreifen bestehen aus einer Aufgabezone, einem Indikatorzonenbereich und einem Absorptionsbereich. Membranen der Sorte Millipore HiFlow Plus 065 werden in Streifen auf eine Größe von 20 mm x 35 mm (Breite/Länge; x/y) zurechtgeschnitten und auf eine Trägerschicht (Backing Sheet, z. B. von G&L) aufgeklebt. Diagonal versetzt werden im Indikatorzonenbereich, der sich in die Indikatorzonenbereiche „Serumgegenprobe/ Antikörpersuche“ (proximal zur Aufgabezone angeordnet) und „Blutgruppenbestimmung“ (distal zur Aufgabezone an-

geordnet) aufteilt, je 0,2 μ l Punkte der verschiedenen Bindungselemente unter Verwendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) aufgetragen:

Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ – Suspensionen von Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1, Blutgruppe A2, Blutgruppe B, Blutgruppe 0, Blutgruppe 0 Rh-Formel $R_1R_1^w$ (Suchzelle 1), Blutgruppe 0 Rh-Formel R_2R_2 (Suchzelle 2), Blutgruppe 0 Rh-Formel R_1R_1 (Suchzelle 3), sowie Anti-human IgG/IgM (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759) als Kontrolle; Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ - Anti-A Antikörper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper – Klon ES-4 (Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper- (Klone AB6, AB26, AB92 (Medion Diagnostics, 010062); anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC, Rockland, 209-4139).

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Serumgegenprobe“ startet mit Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1 in Position $x=3$ mm/ $y=10$ mm, die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A2, B, 0 folgt iterierend in Abständen von $x=2$ mm/ $y=1,5$ mm. Die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts der Suchzelle 1 erfolgt in Position $x=11$ mm/ $y=10$ mm, die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts der Suchzellen 2 und 3 sowie des humanen IgG/IgM iterierend in Abständen von $x=2$ mm/ $y=1,5$ mm. Die Erythrozyten-Ghosts werden als 0.1-0.5%ige (v/v) Suspensionen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper als 1:1 Gemisch in Konzentration von 50 μ g/ml in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position $x=4$ mm/ $y=20$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=4$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10%

(v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.

Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Test-
5 durchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 20x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position y=5 mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

10 Testansatz:

Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen Test werden 120 µl unverdünntes bzw. 1:3 oder 1:6 in Verdünnungspuffer (EnlisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Auf-
15 gabezone aufgetragen. Wenn das Blut die Aufgabezone verlassen hat, wird zweimalig mit 120 µl EnlisstII gewaschen, um ungebundene Erythrozyten aus der Membran zu entfernen. Im Anschluß werden 75 µl anti-IgG/A/M konjugierte Goldpartikel (20 bis 40 nm, Arista Biologicals, CGIGA-0800, CGIGG-0800, CGIGM-0800), 1:10 (v/v) verdünnt in TBS, 0,08 % Gealtine, 0,5 % Albumin auf
20 die Aufgabezone aufgetragen. Anstelle der Goldpartikel können auch farbige, 100 bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet werden, z.B. von Merck Eurolab France/Estapor. Wenn die Goldpartikel die Aufgabezone verlassen haben, wird die Membran nochmals ein- oder zweimalig mit 120 µl EnlisstII gewaschen.

Ergebnis:

25 (a) Kontrollen: Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone XII, Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone VIII, Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“) charakteristisch pupurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel

5 gefärbt ist. Die anti-IgG/IgM-Kontrolle muss in jedem Fall angefärbt sein, so dass bei einer Person mit Blutgruppe AB, die keine irregulären Antikörper hat, die Anfärbung dieser Indikatorzone bei völliger Abwesenheit anderer Signale im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ auf eine korrekte Testdurchführung verweist. Die Indikatorzone IV (Erythrozyten-Ghosts Blutgruppe 0) ist eine negative Kontrolle für Isoagglutinine. Eine Anfärbung dieser Indikatorzone bedeutet, dass neben Isoagglutininen auch irreguläre Antikörper vorhanden sein müssen, d. h. dass mindestens eine der drei Indikatorzonen V, VI, VII ebenfalls angefärbt sein muss. Ist dies nicht der Fall, so ist der Test ungültig.

10

15 (b) Testergebnisse: Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen im Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ rote Punkte (positiv) oder die fast weisse Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Die korrespondierenden Isoagglutinine sind im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel als purpurfarbene Punkte oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar. Bei Abwesenheit eines Isoagglutinins sind keine sich vom Hintergrund unterscheidenden Signale in diesen Positionen zu erkennen. Bei Vorhandensein eines irregulären Antikörpers sind ein, zwei oder

20 alle drei der Indikatorzonen mit den Erythrozyten-Ghosts der Suchzellen 1, 2 oder 3 durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel angefärbt oder in der Farbe, der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar.

25 **Beispiel 3:** Simultane Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test für Spender

Herstellung der Teststreifen:

Der grundsätzliche Aufbau der Teststreifen entspricht dem Teststreifenaufbau in Beispiel 2. Das Format der Millipore HiFlow Plus 065 Membran beträgt 15 mm x 35 mm (Breite/Länge; x/y). Der Indikatorzonen des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ entsprechen dem Beispiel 2. Im Indikatorzonenbereich
5 „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ werden je 0,2 µl Punkte der folgenden Bindungselemente unter Verwendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) dispensiert:

10 Suspensionen von Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1, Blutgruppe A2, Blutgruppe B, Blutgruppe 0, Erythrozytenghosts aus einem Gemisch der Suchzellen 1-3 (siehe Beispiel 2), sowie Anti-human IgG/IgM (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759) als Kontrolle.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Serum-
gegenprobe/Antikörpersuche“ startet mit Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1 in Position x=2,5 mm/ y=10 mm, die Positionierung der Erythro-
15 zyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A2, B, 0 iterierend in Abständen von x=2 mm/ y=1,5 mm. Die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts des Gemisches der Suchzellen 1-3 erfolgt in Position x=10,5 mm/ y=13 mm, die des humanen IgG/IgM in Position x=12,5 mm/ y=14,5 mm. Die Erythrozyten-Ghosts werden als 0.1-0.5%ige (v/v) Suspensionen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10%
20 (v/v) Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper als 1:1 Gemisch in Konzentration von 50 µg/ml in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blut-
gruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position x=3 mm/
25 y=20 mm. Alle anderen Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches werden iterierend in Abständen von x=3 mm/ y=1,5 mm zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.

Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Testdurchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position y=6 mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:

Der Testansatz entspricht dem Ansatz in Beispiel 1.

10 Ergebnis:

(a) Kontrollen: Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone X, Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone VI, Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“) charakteristisch pupurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist. Die anti-IgG/IgM-Kontrolle muss in jedem Fall angefärbt sein, so dass bei einer Person mit Blutgruppe AB, die keine irregulären Antikörper hat, die Anfärbung dieser Indikatorzone bei völliger Abwesenheit anderer Signale im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ auf eine korrekte Testdurchführung verweist. Die Indikatorzone IV (Erythrozyten-Ghosts Blutgruppe 0) ist eine negative Kontrolle. Eine Anfärbung dieser Indikatorzone bedeutet, dass neben Isoagglutininen auch irreguläre Antikörper vorhanden sein müssen, d. h. dass mindestens eine der drei Indikatorzonen V, VI, VII ebenfalls angefärbt sein muss. Ist dies nicht der Fall, so ist der Test ungültig.

25 (b) Testergebnisse: Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen im Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ rote Punkte (positiv) oder die fast weisse Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Die korrespondierenden Isoaggluti-

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

nine sind im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel als purpurfarbene Punkte oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar. Bei Abwesenheit eines Isoagglutinins sind keine sich vom Hintergrund unterscheidenden Signale in diesen Positionen zu erkennen. Bei Vorhandensein eines irregulären Antikörpers sind ein, zwei oder alle drei der Indikatorzonen mit den Erythrozyten-Ghosts der Suchzellen 1, 2 oder 3 durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel angefärbt oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar.

Beispiel 4: Simultane Blutgruppenbestimmung und Nachweis von Infektionsmarkern

Herstellung der Teststreifen:

15 Die Teststreifen bestehen aus einer Aufgabezone, einem Indikatorzonenbereich und einem Absorptionsbereich. Membranen der Sorte Millipore HiFlow Plus 065 werden in Streifen auf eine Größe von 15 mm x 35 mm (Breite/Länge; x/y) zu-
rechtgeschnitten und auf eine Trägerschicht (Backing Sheet z. B. von G&L) auf-
geklebt. Diagonal versetzt werden im Indikatorzonenbereich, der sich in die Indi-
20 katorzonenbereiche „Nachweis von Infektionsmarkern“ (proximal zur Aufgabe-
zone angeordnet) und „Blutgruppenbestimmung“ (distal zur Aufgabezone ange-
ordnet) aufteilt, je 0,2 µl Punkte der verschiedenen Bindungselemente unter Ver-
wendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) aufgetragen:

25 Indikatorzonenbereich „Nachweis von Infektionsmarkern“ – Lösungen rekombi-
nanter Antigene (Syphilis; TpN 15, TpN 17, TpN 47), synthetischer Peptide aus
Sequenzen der Glykoproteine gp-14, gp-41 (HIV-1; HIV-O) und gp-36 (HIV-2),
rekombinante HCV Antigene (C-100, C-200, C33c, C22), monoklonale Antikör-

per (HBsAg) sowie Anti-human IgG/IgM (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759) als Kontrolle; Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ - Anti-A Antikörper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper – Klon ES-4 (Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper - Klone
5 AB6, AB26, AB92 (Medion Diagnostics, 010062); Anti-D Antikörper – Klone LDM3/ESD1 (SNBTS), Anti-CDE Antikörper – Klone MS-24/MS-201/MS 80/MS-258 (Serologicals), Anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC, Rockland, 209-4139).

10 Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Nachweis von Infektionsmarkern“ startet mit synthetischen Peptiden der Spezifität HIV-1 (gp-14, gp-41) in Position $x=2,5$ mm/ $y=10$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=2$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position der Indikatorzone I dispensiert. Die Bindungselemente der Indikatorzonen I-V werden in geeigneten Konzentrationen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v)
15 Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position $x=2,5$ mm/ $y=20$ mm. Alle anderen Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches werden
20 iterierend in Abständen von $x=2$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.

Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min
25 bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Testdurchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2

mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position $y=6$ mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:


Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen
5 Test werden 100 μ l unverdünntes bzw. 1:3 bzw. 1:6 in Verdünnungspuffer (En-
lisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Auf-
gabezone aufgetragen. Wenn das Blut die Aufgabezone verlassen hat, wird zwei-
malig mit 100 μ l EnlisstII gewaschen, um ungebundene Erythrozyten aus der
Membran zu waschen.

- 10 Im Anschluß werden 50 μ l eines Gemisches aus anti-IgG/A/M konjugierten
Goldpartikeln (20 bis 40 nm, Arista Biologicals, CGIGA-0800, CGIGG-0800,
CGIGM-0800), 1:10 (v/v) verdünnt in TBS, 0,08 % Gelatine, 0,5 % Albumin,
sowie anti-HbsAg konjugierten Goldpartikeln (Arista Biologicals, ABHBS-0500)
in geeigneter Verdünnung auf die Aufgabezone aufgetragen. Anstelle der Gold-
15 partikel können auch farbige, 100 bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet wer-
den, z.B. von Merck Eurolab France/Estapor. Wenn diese die Aufgabezone ver-
lassen haben, wird die Membran nochmals ein- oder zweimalig mit 100 μ l En-
lisstII gewaschen.

Ergebnis:

- 20 Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone XII, Indikatorzo-
nenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter
Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone VI, Indikator-
zonenbereich „Nachweis von Infektionsmarkern“) charakteristisch pupurn (Gold-
partikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist. Je nach
25 Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blutgruppenantigene erscheinen an
den entsprechenden Positionen rote Punkte (positiv) oder die fast weisse Hinter-
grundfärbung der Membran (negativ). Bei Vorhandensein von Antikörpern gegen
HIV-1, HIV-2, Syphilis bzw. von Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) ist die


jeweilige Position durch das für Gold-Partikel charakteristische Purpur angefärbt und als purpurfarbene Punkte erkennbar. Wenn Polystyrolpartikel als Indikator-Partikel verwendet werden, ist die jeweilige Position in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt. Im weitaus häufigsten Fall, nämlich einer negativen
5 Reaktion für alle Infektionsmarker, wird nur die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone VI, Indikatorzonenbereich „Nachweis von Infektionsmarkern“) angefärbt.



10 **Beispiel 5: Simultane Blutgruppenbestimmung und Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene**

Herstellung der Teststreifen:

Der grundsätzliche Aufbau und das Format der Teststreifen entspricht dem Teststreifen Aufbau in Beispiel 4. Der Indikatorzonenbereich untergliedert sich in die Indikatorzonenbereiche „Blutgruppenbestimmung“ und „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“. Es werden je 0,2 µl Punkte der folgenden Bindungselemente unter Verwendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) dispensiert:
15



20 Indikatorzonenbereich „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“ – Membranproteine von Thrombozyten der Blutgruppe 0 mit distinkten HPA-Antigenprofilen wie HPA 1bb3aa5bb und HPA 1aa3bb5aa sowie Anti-human IgG/IgM (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759) als Kontrolle; Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ - Anti-A Antikörper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper – Klon ES-4 (Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper – Klone AB6, AB26, AB92 (Medion
25 Diagnostics, 010062); Anti-D Antikörper – Klone LDM3/ESD1 (SNBTS), Anti-CDE Antikörper – Klone MS-24/MS-201/MS 80/MS-258 (Serologicals), Anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC, Rockland,

209-4139). Als Alternative zu den Membranproteinen der Thrombozyten können auch rekombinante Antigene mit den entsprechenden Merkmalsausprägungen (HPA-Antigenprofile) aufgetragen werden.

5 Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“ startet mit Membranproteinen Antigenprofil HPA 1bb3aa5bb in Position $x=4$ mm/ $y=10$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=3,5$ mm/ $y=2$ mm zur Position der Indikatorzone I dispensiert. Die Bindungselemente der Indikatorzonen I und II werden in geeigneten Konzentrationen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer
10 pH 7,5, 10% (v/v) Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper in einer Konzentration von 50 µg/ml in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ entspricht dem Beispiel 4.

15 Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Testdurchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2
20 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position $y=6$ mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:

Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen Test werden 100 µl unverdünntes bzw. 1:3 bzw. 1:6 in Verdünnungspuffer (EnlisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Auf-
25 gabezone aufgetragen. Wenn das Blut die Aufgabezone verlassen hat, wird zweimalig mit 100 µl EnlisstII gewaschen, um ungebundene Erythrozyten aus der Membran zu waschen.

Im Anschluß werden 50 µl eines Gemisches aus anti-IgG/A/M konjugierten Goldpartikeln (20 bis 40 nm, Arista Biologicals, CGIGA-0800, CGIGG-0800, CGIGM-0800), 1:10 (v/v) verdünnt in TBS, 0,08 % Gelatine, 0,5 % Albumin auf die Aufgabezone aufgetragen. Anstelle der Goldpartikel können auch farbige, 100
5 bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet werden, z.B. von Merck Eurolab France/Estapor. Wenn die Goldpartikel die Aufgabezone verlassen haben, wird die Membran nochmals ein- oder zweimalig mit 100 µl Enlist II gewaschen.

Ergebnis:

Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone IX, Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone III, Indikatorzonenbereich „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“) charakteristisch pupurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist. Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen
10 Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen rote Punkte (positiv) oder die fast weisse Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Bei Vorhandensein von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene ist die jeweilige Position durch das für Gold-Partikel charakteristische Purpur angefärbt und als purpurfarbene Spots erkennbar. Wenn Polystyrolpartikel als Indikator-Partikel
15 verwendet werden, ist die jeweilige Position in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt.
20

Patentansprüche

- 5 1. Vorrichtung zum gleichzeitigen, qualitativen oder quantitativen Bestimmen mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend eine Membran (2) mit
- einer Aufgabezone (5) zum Auftragen der flüssigen Probe,
 - mindestens zwei Indikatorzonen, die mit dem/den Analyten in Wechselwirkung treten können und
 - 10 - mindestens einem Absorptionsbereich (3), welcher die Flüssigkeit nach Passieren der Indikatorzonen aufnimmt,
- wobei die Indikatorzonen zwischen der Aufgabezone (5) und einem Absorptionsbereich (3) liegen, dadurch gekennzeichnet, dass
- 15 die Fließrichtungen von der Aufgabezone (5) durch die jeweiligen Indikatorzonen zu einem Absorptionsbereich (3) (Fließspuren) im Wesentlichen parallel sind und mindestens zwei unterschiedliche Fließspuren vorliegen.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Indikatorzonen so angeordnet sind, dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur nicht mehr als eine Indikatorzone durchströmt.
- 20 3. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Indikatorzonen in einer diagonalen, V-, W-, M-, N-förmigen oder linearen Reihe angeordnet sind.
- 25 4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens zwei Reihen von Indikatorzonen in Fließrichtung hintereinander und/oder seitlich versetzt angeordnet sind und die Indikatorzonen der verschiedenen Reihen zueinander auf Lücke angeordnet sind, so dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur nicht mehr als eine Indikatorzone durchströmt.

5. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 3, wobei mindestens zwei Reihen von Indikatorzonen in Fließrichtung hintereinander und/oder seitlich angeordnet sind und die Indikatorzonen der verschiedenen Reihen zueinander nicht auf Lücke
5 angeordnet sind, so dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur mehr als eine Indikatorzone durchströmt.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Indikatorzonen Antikörper bzw. Antikörperfragmente, Lektine bzw. Fragmente davon, Antigene
10 bzw. Antigen-Epitope und/oder Zellen bzw. Zellfragmente umfassen.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Indikatorzonen insbesondere Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente gegen Blutgruppenantigene
15 bzw. -antigen-Epitope und Membranen bzw. Zellfragmente von Blutgruppe A1, A2, B und/oder 0 Erythrozyten umfassen.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Indikatorzonen insbesondere Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente gegen Blutgruppenantigene
20 bzw. -antigen-Epitope und synthetische Peptide, rekombinante Antigene und/oder Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente gegen infektiöse Marker umfassen.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Indikatorzonen insbesondere Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente gegen Blutgruppenantigene
25 bzw. -antigen-Epitope und Fragmente von Thrombozyten und/oder Lymphozyten umfassen.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Membran (2) vorzugsweise aus Polyethylen, Nitrozellulose oder Nylon, besteht.
- 30

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei hinter der Aufgabebzone (5) und vor den Indikatorzonen auf der Membran (2) mindestens ein Dichtelement (4) angeordnet ist.
- 5 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Komponenten der Vorrichtung zur mechanischen Verstärkung auf eine Trägerschicht (1) aufgebracht sind.
- 10 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Komponenten der Vorrichtung in einem Gehäuse integriert sind.
14. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Analyse von Blut, insbesondere zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörpersuch-Test.
- 15 15. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Analyse von Blut, insbesondere zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und des Nachweises von infektionsserologischen Markern bzw. Fragmenten davon.
- 20 16. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Analyse von Blut, insbesondere zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und des Nachweises von Antikörpern gegen Blutzellen, insbesondere anti-Thrombozyten oder anti-Lymphozyten Antikörper, bzw. jeweils Fragmenten davon.
- 25 17. Verfahren zur Bestimmung mehrerer Analyten oder deren Derivate in einer flüssigen Probe, umfassend:
- 30 das Auftragen der Probe auf die Aufgabebzone (5) einer Membran (2) der Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 13, wobei

diese Probe in ausreichender Menge vorliegt, um die Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in Richtung Absorptionsbereich (3) durch die Indikatorzonen zu fließen und um die Analyten oder ihre Derivate in der Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in den Indikatorzonen einen Komplex zu bilden.

5

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Analyte oder deren Derivate Blutgruppenantigene bzw. -antigen-Epitope, gegen Blutgruppenantigene gerichtete Antikörper bzw. Fragmente davon, gegen Thrombozyten- oder Leukozyten gerichtete Antikörper bzw. Fragmente davon oder gegen infektiöse Agenzien gerichtete Antikörper bzw. Fragmente davon oder Antigene infektiöser Agenzien bzw. Antigen-Epitope sind.

10

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Analyte oder deren Derivate insbesondere Antigene bzw. Antigen-Epitope der Blutgruppensysteme AB0, Rh und Kell umfassen.

15

20. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Analyte oder deren Derivate insbesondere Antikörper bzw. Fragmente davon gegen Thrombozyten und/oder Lymphozyten umfassen.

20

21. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Analyte oder deren Derivate insbesondere Antikörper bzw. Fragmente davon gegen bakterielle und/oder virale Agenzien bzw. virale oder bakterielle Antigene bzw. Antigen-Epitope umfassen.

25

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 21, wobei die flüssigen Proben vorzugsweise aus Vollblut, Blutzell-Konzentrat, Serum, Plasma und/oder Testflüssigkeit, beispielsweise Kontrollserum oder Kontrollzellen, bestehen.

30

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei mindestens zwei Sorten Indikatorpartikel verwendet werden, von denen mindestens eine Sorte Erythrozyten sind.

Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum gleichzeitigen, qualitativen oder quantitativen Bestimmen mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend eine Membran 2 mit

- einer Aufgabebzone 5 zum Auftragen der flüssigen Probe,
- mindestens zwei Indikatorzonen, die mit dem/den Analyten in Wechselwirkung treten können und
- mindestens einem Absorptionsbereich 3, welcher die Flüssigkeit nach Passieren der Indikatorzonen aufnimmt,

wobei die Indikatorzonen zwischen der Aufgabebzone 5 und einem Absorptionsbereich 3 liegen, dadurch gekennzeichnet, dass

15 die Fließrichtungen von der Aufgabebzone 5 durch die jeweiligen Indikatorzonen zu einem Absorptionsbereich 3 (Fließspuren) im Wesentlichen parallel sind und mindestens zwei unterschiedliche Fließspuren vorliegen.

Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung mehrerer Analyten oder deren Derivate in einer flüssigen Probe, umfassend:

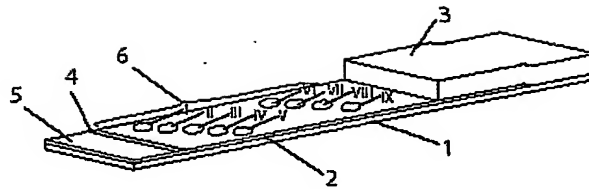
20 das Auftragen der Probe auf die Aufgabebzone 5 einer Membran 2 der Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 8, wobei diese Probe in ausreichender Menge vorliegt, um die Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in Richtung Absorptionsbereich 3 durch die Indikatorzonen zu fließen und um die Analyten oder ihre Derivate in der Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in den Indikatorzonen einen Komplex zu bilden.

25
Figur 1

Prisma Diagnostika GmbH

9. Juli 2003
M100286 BUW/Kös/brä

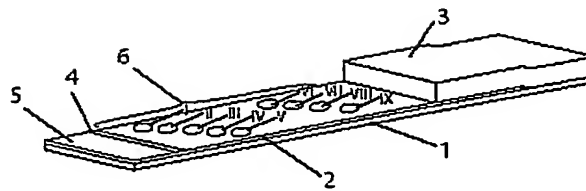
Figur 1



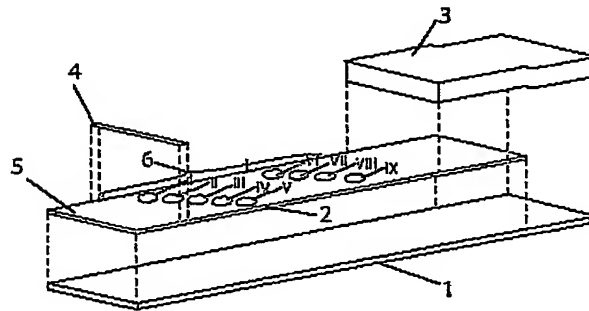
Prisma Diagnostika GmbH

9. Juli 2003
M100286 BUW/Kös/brä

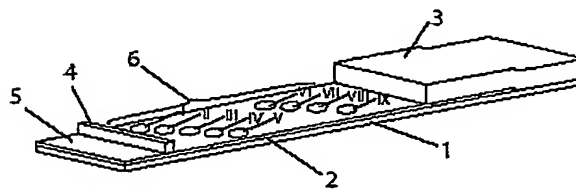
Figur 1



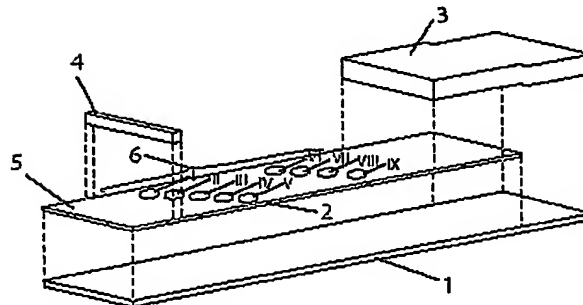
Figur 2



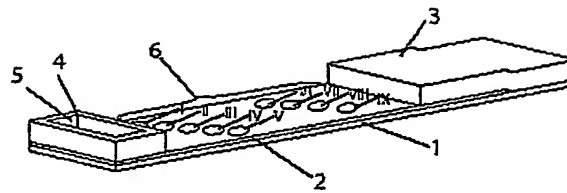
Figur 3



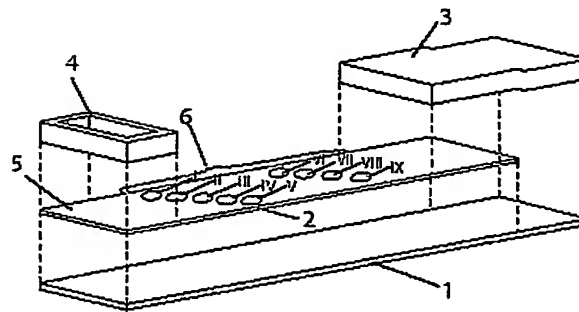
Figur 4



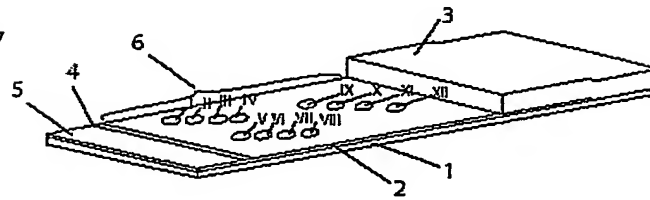
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8

